

B36

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-248190

(43)公開日 平成9年(1997)9月22日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09	ZNA	9282-4B	C 12 N 15/00	ZNAA
C 07 H 21/04			C 07 H 21/04	B
C 07 K 14/47			C 07 K 14/47	
C 12 N 5/10			C 12 N 9/16	D
9/16			9/20	

審査請求 未請求 請求項の数8 FD (全16頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-86022	(71)出願人	596048411 東城 博雅 兵庫県西宮市甲陽園山王町1-88-305
(22)出願日	平成8年(1996)3月15日	(71)出願人	390022998 東燃株式会社 東京都渋谷区広尾一丁目1番39号 恵比寿 プライムスクエアタワー
特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年7月25日 社団法人日本生化学会発行の「生化学 V o l. 67, N o. 7」に発表		(72)発明者	東城 博雅 兵庫県西宮市甲陽園山王町1-88-305
		(72)発明者	長谷川 明 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1 号 東燃株式会社総合研究所内
		(74)復代理人	弁理士 石田 敬 (外4名)

(54)【発明の名称】 新規ホスホリパーゼ及びそれをコードするDNA

(57)【要約】

【課題】 新規なホスホリパーゼの提供。

【解決手段】 ホスホリパーゼB活性、リゾホスホリパ  
ーゼ活性及びリパーゼ活性を併有し、図1に示す構造を  
有する蛋白質、又はその第二反復配列を含んで成る酵素  
活性断片、並びにそれをコードする遺伝子系及び該蛋白  
質の製造方法。

### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ホスホリパーゼB活性及びリパーゼ活性を共に有し、配列番号：1に示すアミノ酸配列中少なくとも第367位のアミノ酸Lysから第712位のアミノ酸Asnまでのアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列に対して1個又は数個のアミノ酸の置換、欠失又は付加により修飾されているアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項2】 配列番号：1の第367位のアミノ酸Lysから第712位のアミノ酸Asnまでのアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列に対して1個又は数個のアミノ酸の置換、欠失又は付加により修飾されているアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の蛋白質。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の蛋白質をコードするDNA。

【請求項4】 配列番号：1に記載の塩基配列を有するDNAとハイブリダイズし、且つホスホリパーゼB活性及びリパーゼ活性の両方を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項5】 請求項4に記載のDNAによりコードされている蛋白質。

【請求項6】 請求項3又は4に記載のDNAを含んで成るベクター。

【請求項7】 請求項6に記載のベクターにより形質転換された宿主。

【請求項8】 請求項7に記載の宿主を培養し、そして培養物から、ホスホリパーゼB活性及びリパーゼ活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする、ホスホリパーゼ蛋白質の製造方法。

### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は新規なホスホリパーゼ、該ホスホリパーゼをコードする遺伝子系、及び該ホスホリパーゼの製造方法に関する。本発明のホスホリパーゼはホスホリパーゼ活性及びリパーゼ活性を併せ持ち、肺臓ホスホリパーゼ補充療法剤、ホスホリパーゼB／リパーゼ測定用試薬等として有用である。

#### 【0002】

【従来の技術】 ホスホリパーゼはリン脂質を加水分解する酵素の総称であり、リン脂質（グリセロールリン脂質）は、グリセロールの末端及び中央のヒドロキシル基に脂肪酸がエステル結合しており、他方の末端のヒドロキシル基にリン酸基を介してコリン、エタノールアミン等が結合している化合物である。グリセロールリン脂質中のグリセロール基のsn-1位の脂肪酸エステル結合を加水分解するホスホリパーゼをホスホリパーゼA<sub>1</sub>と称し、グリセロール基のsn-2位の脂肪酸エステル基を加水分解するホスホリパーゼをホスホリパーゼA<sub>2</sub>と称し、また、ホスホリパーゼA<sub>1</sub>活性及びホスホリパーゼA<sub>2</sub>活性を併有するホスホリパーゼをホスホリパーゼBと称する。

【0003】 また、リン脂質中の末端又は中央の脂肪酸アシル基の内一方が除去されたリン脂質をリゾリン脂質と称し、リゾリン脂質に作用して残っている脂肪酸エステル結合を加水分解する酵素も、分解生成物が前記ホスホリパーゼBの場合と同じであるため、ホスホリパーゼBに含まれられる。他方、リン脂質のグリセロール基とリン酸基との間のエステル結合を加水分解するホスホリパーゼをホスホリパーゼCと称し、リン酸基とコリンやエタノールアミン等との間の結合を加水分解するホスホリパーゼをホスホリパーゼDと称する。他方、脂肪酸のグリセリンエステルのアシル基を加水分解する酵素をリパーゼと称する。従来、ホスホリパーゼB活性とリパーゼ活性とを併有する酵素は知られていない。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明は、ホスホリパーゼB活性とリパーゼ活性とを併有する新規な酵素を提供しようとするものである。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】 従って本発明は、ホスホリパーゼB活性及びリパーゼ活性を共に有し、配列番号：1に示すアミノ酸配列中の少なくとも第367位のアミノ酸Lysから第712位のアミノ酸Asnまでのアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列に対して1個又は数個のアミノ酸の置換、欠失又は付加により修飾されているアミノ酸配列を有する蛋白質、並びに配列番号：1に示す塩基配列とハイブリダイズすることができるDNAによりコードされており、且つホスホリパーゼB活性及びリパーゼ活性を併有する蛋白質を提供する。

【0006】 本発明はさらに、上記の蛋白質をコードするDNA、該DNAを含んで成る組換えベクター、特に発現ベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主に関する。本発明はまた、上記の宿主を培養し、該培養物から、ホスホリパーゼB活性及びリパーゼ活性を併有する酵素を採取することを特徴とする該酵素の製造方法に関する。

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

##### 酵素蛋白質

本発明の酵素は、単一の酵素としてホスホリパーゼ活性（リゾホスホリパーゼ活性を含めて）及びリパーゼ活性を有する多機能酵素である。例えば、ラットの小腸から精製した酵素は、ラット小腸膜分画から自己消化によって可溶化され、SDS-PAGEにより測定した分子量は非還元条件下で約35kDaであり、還元条件下では14kDa及び21kDaの2本のバンドとして示される。ラットの近位回腸からのcDNAによりコードされている蛋白質は配列番号：1に示す1位のアミノ酸Metから1443位のアミノ酸Glnまでのアミノ酸配列を有する。

【0008】 この蛋白質は、図1に示すように、そのN

—末端に、1位のMetから第30位のGlyまでのアミノ酸配列を有するシグナルペプチドを有し、C—末端に1421位のLeuから第1443位のTrpまでのアミノ酸配列を有する膜結合ドメインを有し、これらの間に4個の反復配列、すなわち第43位のLeuから第352位のAsnまでの第一反復配列、第367位のLysから第712位のAsnまでの第二反復配列、第714位のGlyから第1059位のAsnまでの第三反復配列、及び第1070位のAsnから第1408位のGlnまでの第四反復配列が存在し、この内図4に示すごとく、第二反復配列にホスホリバーゼB活性、リゾホスホリバーゼ活性及びリバーゼ活性が存在する。

【0009】従って本発明の酵素蛋白質は、配列番号：1に示すアミノ酸配列の内、少なくとも第二反復配列に相当する第367位のLysから712位のAsnまでのアミノ酸配列を有し、このアミノ酸配列のN—末端及び／又はC—末端に更なるアミノ酸又はアミノ酸配列が付加されていてもよい。一般に、天然型酵素のアミノ酸配列中で少数のアミノ酸を変更しても本来の酵素活性が維持されることが知られている。

【0010】従って、本発明の酵素は、上記のアミノ酸配列において1個～数個、例えば10個以下のアミノ酸が付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されたアミノ酸配列を有していてもよい。本発明はさらに、配列番号：1に示す塩基配列を有するDNAと所定のストリンジンシー条件下、例えば65℃、16時間(5×SPE、0.5% SDS、1×Dendardt溶液、20μg/mlサケ精子DNA)においてハイブリダイズするDNAによりコードされており、且つホスホリバーゼB活性(リゾホスホリバーゼ活性を含む)とリバーゼ活性とを併有する酵素をも包含する。

#### 【0011】遺伝子系

本発明はさらに、本発明の酵素をコードしており、該酵素の製造のために有用な遺伝子系すなわち、前記の種々のアミノ酸配列をコードするDNA、該DNAを含んで成る組換えベクター、特に発現ベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主に関する。本発明のDNAの塩基配列は、前記の種々のアミノ酸配列をコードするものであればよいが、一例として、配列番号：1に示すコード領域の塩基配列又はその一部分から成るもののが挙げられる。

【0012】このDNAは、適当なcDNAライブラリーから選択されたcDNA、またはゲノミックDNAライブラリーから選択されたDNAであってもよい。cDNAやゲノミックDNAの選択は、例えば、本発明の酵素の部分アミノ酸配列に基いて設計されたDNAプローブを用いて行うことができ、あるいはそのようにして設計されたDNAをプライマーとして用いてPCR法により増幅してもよい。

【0013】また、修飾されたアミノ酸配列を有する酵

素をコードするDNAは、前記のDNAライブラリーのスクリーニング又はPCR法により得た、生来の塩基配列を有するDNAを基礎にして、常用の部位特定変異誘発やPCR法を用いて合成することができる。例えば、修飾を導入したい部位を含むDNA断片を、上記により得られたcDNA又はゲノミックDNAの制限酵素消化により得、これを錠型にして、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特定変異誘発又はPCR法を実施し、所望の修飾を導入したDNA断片を得、これを、目的とする酵素の他の部分をコードするDNAに連結すればよい。

【0014】あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列を有する酵素をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを、所望の制限酵素により切断し、得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合には、不足部分を合成DNAを連結することにより補えばよい。

【0015】本発明はまた、前記のDNAを含んで成る組換えベクター、特に発現ベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主に関する。宿主としては、原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては、細菌、例えばエシエリヒア(*Escherichia*)属に属する細菌、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)、バシリス(*Bacillus*)属微生物、例えばバシリス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)、等常用の宿主を用いることができる。

【0016】真核性宿主としては、下等真核生物、例えば真核性微生物、例えば真菌である酵母又は糸状菌が使用できる。酵母としては、例えばサッカロミセス(*Saccharomyces*)属微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス(*Aspergillus*)属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガエ(*Aspergillus niger*)、ペニシリウム(*Penicillium*)属微生物等が挙げられる。さらに、動物細胞又は植物細胞が使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに、昆虫細胞、例えばカイコの細胞、又はカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

【0017】本発明の発現ベクターは、それらを導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーター及びターミネーター、複製起点等を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えばlac, T7, trp等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばADH1, PHO5等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えば、グルコアミラーゼ遺伝子、α-アミラーゼ遺伝子等のプロモーターが使用される。また、動物細胞宿主用プロ

ロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばS V 4 0 、単純ヘルペス、チミジンキナーゼ (TK) 、プロモーター等が使用される。

【0018】発現ベクターの作製は、制限酵素、リガーゼ等を用いて常法に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主の形質転換も、常法に従って行うことができる。本発明はまた、ホスホリパーゼB活性及びリパーゼ活性を併有する前記蛋白質の製造方法に関する。前記の発現ベクターにより形質転換された宿主を培養又は飼育し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とする蛋白質を回収、精製することができる。本発明の酵素はまた、それを含有する組織又は器官、例えばラット小腸から上記のようにして回収、精製することもできる。本発明の酵素は、例えば肺臓リパーゼ補充療法剤、小腸疾患の診断薬としてのホスホリパーゼ／リパーゼ測定系の試薬等として有用である。

#### 【0019】

【実施例】次に、本願発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

##### 実施例1. ホスホリパーゼB／リパーゼの精製

ラット小腸刷子縁膜からのホスホリパーゼB／リパーゼの精製を以下のように行った。ペントバルビタール麻酔下に切除したラット小腸を-35℃で約2カ月間保存すると、その間にホスホリパーゼB／リパーゼは限定分解により刷子縁膜から可溶化された。

【0020】可溶化酵素をQAE-トヨパール、フェニルセファロース、QAE-トヨパール、ヒドロキシアパタイト、Con A-セファロース及びコスモゲルQAの各クロマトグラフィーを用いて、約8200倍に精製した。精製標品は非還元条件のSDS-電気泳動において35kDaの位置に単一バンドとして泳動され、このバンドに一致してホスホリパーゼA<sub>2</sub>活性、リゾホスホリパーゼ活性及びリパーゼ活性が認められた。

【0021】一方、還元条件のSDS-電気泳動では35kDaのバンドは消失し、代りに21kDaと14kDaの二本のバンドが見られたが酵素活性は検出できなかつた。本酵素の至適pHは、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>活性、リゾホスホリパーゼ活性及びリパーゼ活性ともに9付近であった。1-アルキルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルコリン及びジアシルホスファチジルエタノールアミンに対する反応性は、デオキシコール酸との混合ミセルを基質とした場合、大差はなかった。ジラジルリン脂質リポソームに対する反応性は低いが、胆汁酸／ジラジルリン脂質混合ミセル及びリゾアルキルミセルに対する反応性は高い。したがってホスホリパーゼA<sub>2</sub>／リゾホスホリパーゼ活性比は、基質の存在様式により異なる。

##### 【0022】実施例2. ホスホリパーゼB／リパーゼの

#### 部分アミノ酸配列の決定

精製された酵素を還元カルボキシメチル化し、逆相HPLCで分離して14kDaと21kDaの二種類のポリペプチド鎖を得た。それぞれのN末端からのアミノ酸配列をシークエンサーで決定した。その結果、14kDaのポリペプチド及び21kDaのポリペプチドからそれぞれ次のアミノ酸配列が得られた。

(1) Glu Gly Thr Lys Phe Thr Cys Pro Asp Lys Asp Pro Ser Asp Ser Ile Pro (配列番号：2)

(2) Phe Ser Pro Gln Thr Phe Thr Asp Asn Ile Lys Thr Ala Leu Asp Ile Leu His Ala Glu Val Pro Arg Ala Phe Val Asn Met Val Ser (配列番号：3)

【0023】上記のアミノ酸配列中9個又は10個のアミノ酸に基いて下記のプライマー-KF及びQTを設計し、常法に従って合成した。なお、プライマー-KFの5'一末端の8塩基は人為的に付加したBamHI認識配列である。

プライマー-KF : ccggatccAA(A/G)TT(C/T)ACITG(C/T)CCIGA(C/T)AA(A/G)GA(C/T)CC (配列番号：4)

プライマー-QT : GCIGT(C/T)TTIAT(A/G)TT(A/G)TCIGT(A/G)AANGT(C/T)TG (配列番号5)

#### 【0024】実施例3. cDNAのクローニング

実施例2において合成したプライマーを用いてラットcDNAライプラリーを用いて、DNA断片をクローニングした。ラットcDNAライプラリーは次のようにして作製した。常法により回腸から抽出した1μgのRNAを錆型として、200Uの逆転写酵素(SuperScript RT)によりcDNAを合成した。1/2量の合成cDNAと上記プライマー-KFとプライマー-QT(各100pmol)を用いPCR法によりホスホリパーゼB／リパーゼcDNA断片を増幅した。PCR1サイクルの条件は、94℃、40秒；54℃、1分；72℃、1分であり、これを30サイクル行なった。

【0025】增幅産物は、5%ポリアクリルアミドゲル上単一バンド(540bp)であったため、pCR IIプラスミドベクターに直接挿入した。こうして、540bpのDNA断片を得た。この断片は、ホスホリパーゼB／リパーゼの一部をコードしており、全長をコードしていないので、このcDNA断片をプローブとして、ラット近位回腸から、λMOS E10xクローニングベクター(Amersham)を用いて、cDNAライプラリーを作製した。このcDNAライプラリーは、次の様にして作製した。

【0026】ラット回腸から精製したポリ(A)<sup>+</sup>RNA 6μgを用いて、常法により2本鎖cDNAを合成した。cDNAの両端を平滑化後EcoRIアダプターを付加し、500bpより長いcDNAをスパンカラムにより集めた。このcDNAをλMOS E10xのEcoRI部位に挿入した。このベクターを用い常法によりin vitroパッケージング反応を行なってライプラリーを完

成させた。

【0027】スクリーニングのためのハイブリダイゼーションは次の様にして行った。上記の540bp cDNAを<sup>32</sup>Pでラベルした。ラベル化プローブ（5×10<sup>7</sup>cpm）を100mlの5×SSPE、0.5%SDS、1×Denhardt溶液、20μg/ml変性サケ精子DNAを含む緩衝液中で65℃16時間ナイロンフィルター上のレプリカと反応させた。未反応のプローブは、65℃0.2×SSPE、0.1%SDS中で洗浄した。

【0028】こうして、19個の陽性クローニングを得、その1つをpMOS-RIPLBと称し、その全塩基配列をサンガー法により決定した。その結果を配列番号：1に示す。このDNAは、全長4613bpのcDNAであり、1450個のアミノ酸から成るアミノ酸配列をコードする1個のオープンリーディングフレーム（ORF）を含有し、そのN-末端には約30残基のシグナル配列を含んでいた。このアミノ酸配列において、成熟蛋白質部分は4回の相同的な繰り返し配列と、C-末端側の疎水性の膜結合部位とから構成されていた。この構成を図1に模式的に示す。なお、配列番号：1において、プライマーKFは第371位から第379位までのアミノ酸に対応し、プライマーQTは第532位のアミノ酸から第541位のアミノ酸までに対応した。

#### 【0029】実施例4. 酵素活性部位の決定

図1に示す全長蛋白質のどの部分に酵素活性があるかを明らかにするため図2に示すように、全長蛋白質の発現プラスミドpSVL-RIPLBに加えて、膜結合ドメインのみを除去した蛋白質（配列番号：1中、第1位のMetから第1408位のGlnまでのアミノ酸配列を有する）をコードする発現プラスミドpSVL-ΔC、シグナルペプチドと第一反復配列とで構成される蛋白質（配列番号：1中、第1位のMetから第357位のGlnまでのアミノ酸配列を有する）をコードする発現プラスミドpSVL-#1、

【0030】シグナルペプチドと第二反復配列とから構成される蛋白質（配列番号：1中、第1位のMetから第40位のPheまでのアミノ酸配列と、第366位のMetから第712位のAsnまでのアミノ酸配列を有する）をコードする発現プラスミドpSVL-#2、シグナルペプチドと第三反復配列とから構成される蛋白質（配列番号：1中、第1位のMetから第40位のPheまでのアミノ酸配列と、第712位のAsnから第1059位のAsnまでのアミノ酸配列を有する）をコードする発現プラスミドpSVL-#3、及びシグナルペプチドと第四反復配列とから構成される蛋白質（第1位のMetから第40位のPheまでのアミノ酸配列と、第1068位のIleから第1408位のGlnまでのアミノ酸配列とを有する）をコードする発現プラスミドpSVL-#4を、次の様にして作製した。なお、この作製過程を図3及び4に示す。

【0031】pMOS-RIPLBをBamHIで切断して、cDNAをアガロース電気泳動で回収し、発現用ベクターpSVLのBamHI部位に挿入した。このベクターをpSVL-RIPLBと名づけた。シグナル配列部分をそれぞれの反復配列cDNAに連結するため、まず、第1位Metから第40位PheまでをコードするcDNAとその3'末端にNheI, DraI、ストップコドン、BamHIの順序のクローニングサイトを連結したDNA断片をPCR法により合成した。この際、プライマーとしてU18とNrevを用い、錠型としてpSVL-RIPLBを用いた。

【0032】このcDNA断片をpMOSblueに挿入し、pMOS-headと名付けた。次にpMOS-headをApaIとBamHIで切断したcDNA断片と、pSVL-RIPLBを同様に切断したプラスミッド側断片を回収し、お互いにつなぎ合わせてpSVL-headを作成した。pSVL-headには、NheI, DraI, MluI, BamHIのクローニングサイトが存在するので、これを用いてpSVL-#1, pSVL-#2, pSVL-#3, pSVL-#4, pSVL-ΔCを作成した。

【0033】（1）pSVL-#1の作成：pSVL-RIPLBからApaIとPvuIIで切り出したcDNA断片と、pSVL-headからApaIとDraIで切断したプラスミッド側断片を連結して、pSVL-#1を作成した。

（2）pSVL-#2, -#3, -#4の作成：5'末端にNheI配列のあるセンス方向のプライマー（F2, F3, F4）と5'末端にMluIとストップコドンのあるアンチセンス方向のプライマー（R2, R3, R4）、錠型としてpSVL-RIPLBを用いてPCR法により第2、第3および第4反復配列部分cDNAを合成した。これらのPCR産物を、pSVL-headをNheIとMluIで切断したプラスミッド側断片にクローニングして、pSVL-#2, -#3および-#4を作成した。

（3）pSVL-ΔCの作成：pSVL-RIPLBをBamHIで切断して作成したプラスミッド側断片にpSVL-#4のBamHI断片を挿入してpSVL-ΔCを作成した。

#### 【0034】実施例5. 蛋白質の発現

実施例4に記載した各プラスミドを用いて常法に従ってCOS細胞を形質転換した後、形質転換されたCOS細胞をダルベコ・改変イーグル培地で37℃にて72時間培養し培養上清を採取後、細胞を剥離し、600μlのHEPES緩衝生食水に浮遊させた。細胞浮遊液を30秒2回超音波破碎し、1000g10分間4℃で遠心して上清を回収した。さらに上清を4℃で100,000g、45分間遠心し上清と沈殿に分離した。沈殿画分はHEPES生食200μlに分散させた。

【0035】以上のようにサンプルを調製し、酵素活性（ホスホリパーゼA<sub>2</sub>活性、リゾホスホリパーゼ活性、及びリパーゼ活性）を次のようにして測定した。酵素活性は、基質（1 mM）としてホスホリパーゼA<sub>2</sub>反応には、1-パルミトイール-2-オレオイルホスファチジルコリン（POPC）、リパーゼ反応にはトリオレオイルグリセロール（TOG）、リゾホスホリパーゼ反応には、1-パルミトイールグリセロホスホコリン（LPC）を用い、0.1M Tris-HCl (pH 8.5)、0.1M NaCl、胆汁酸（ホスホリパーゼA<sub>2</sub>反応では6 mMコール酸、リパーゼ反応では、6 mMデオキシコール酸、リゾホスホリパーゼ反応では無添加）、10 mM EDTAを含む溶液50 μl中37°Cで測定した。反応はDol 1 e試薬（n-ヘプタン/2-ブロパンール/2 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、10:40:1 v/v）200 μlを加え停止し、さらにn-ヘプタン120 μl、水70 μl、内部標準物質マルガリン酸5 nmolを加え、反応産物の脂肪酸をn-ヘプタン層に抽出した。抽出した脂肪酸を9-アントリルジアゾメタンで誘導体化後、逆相HPLC（9.8%アセトニトリル/2% H<sub>2</sub>O、アイソクラティック溶出）で分離、定量した。検出は、254 nmのUV吸収を用いて行った。

【0036】その結果、図5に示すように、いずれの酵素活性も、全長蛋白質（プラスミドpSVL-RIPBから発現）及び第二反復配列（及びシグナル配列）から成る蛋白質（プラスミドpSV-#2から発現）において認められ、酵素活性部位が第二反復配列中に存在することが確認された。さらに、前記の試料をイムノプロッティング法により分析し、また前記培養細胞中のRNAについてノーザンプロッティング法による分析を行った。

【0037】イムノプロッティング：試料として、pSVL-RIPBで形質転換された細胞の場合は膜画分、それ以外のベクターを導入した細胞の場合には、培養上清を用いた。10% SDS-PAGEアクリルアミドゲル各レーンに20 μgの蛋白質量をのせた。泳動後PVDF膜にプロットした。1次抗体として、ホスホリパーゼB/リパーゼの第450～1450番目のアミノ酸配列に対応する蛋白質に対するウサギポリクローナル抗体を用い、2次抗体としてペルオキシダーゼラベル化抗ウサギIgG抗体を用いた。コニカイムノステインHRPキットにより発色させた。

【0038】ノーザンプロッティング：培養細胞から酸グアニジニウムチオシアネート-フェノールクロロホルム抽出法により全RNA画分を調製<各レーンに30 μgの全DNAをのせた。>した。<sup>32</sup>Pラベル化全長RIPB cDNAをプローブとして5×SSPE、5×Denhardt溶液、0.5% SDS、20 μg/ml精子DNA溶液中、42°C、16時間ハイブリダイズさせた。洗浄は65°Cで行なった。その結果を図6に示す。

す。

【0039】発現ベクターpSVL-ΔC, pSVL-#1, pSVL-#2, pSVL-#3, pSVL-#4を導入したCOS細胞では、それぞれのcDNAに対応する大きさのmRNAが発現していたが、cDNAを含まないpSVLのみを導入した細胞では本酵素のmRNAの発現は見られなかった。pSVL-RIPB導入細胞では膜分画に200 kDaの酵素が検出されたが（C-末端疎水領域を欠くpSVL-ΔC導入細胞では培養上清に酵素が検出された。この結果、C-末端疎水性ドメインが膜結合に関与することが明らかとなった。また、第2、第4反復配列に対応する酵素は、培養上清に検出されたが第1、第3反復配列に対応する酵素は検出できなかった。本実験に用いた抗体の反応性が各々の反復配列部分で異なっていることが示唆される。

#### 【0040】実施例6. ホスホリパーゼB/リパーゼの生体内分布

ホスホリパーゼB/リパーゼ酵素の生体内分布を調べるために、ラットの小腸、脳、肺、食道、胃、十二指腸、回腸、盲腸、結腸、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、精巣及び卵巣からRNAを抽出し、前記のcDNAをプローブとして用いて、ノーザンプロット法により、ホスホリパーゼB/リパーゼ酵素をコードする遺伝子の分布を観察した。その結果、図7に示すように、小腸のほかに、食道及び精巣にも、小腸からのmRNAと同じ長さであり、且つプローブcDNAとハイブリダイズするmRNAが存在することが明らかとなり、本酵素が消化以外の役割を担っている可能性が示された。また、十二指腸、空腸、回腸（上部）及び回腸（下部）の粘膜、並びに食道の粘膜及び筋肉からの抽出したRNAの結果を図8に示す。

【0041】ホスホリパーゼB/リパーゼは、小腸口側よりも肛門側の回腸とりわけ上部回腸粘膜に豊富に存在していた。したがって、食物中の脂質は、まず、小腸上部の管腔内で脾臓から分泌されたリパーゼやホスホリパーゼA<sub>2</sub>の作用で分解され、その後、回腸の本酵素により経末消化を受けることが示唆された。食道上皮は、小腸上皮と異なり刷子縁を持たない偏平上皮細胞から成るので本酵素の分布を上皮と固有筋層に分けて検討した。食道においても本酵素は上皮細胞に存在していた。

#### 【0042】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：4613bp

配列の型：核酸

鎖の型：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起原

生物名：ラット

直接の起原：プラスミドpSVL-RIPLB  
 特徴  
 アミノ酸配列 1...30 シグナル  
 アミノ酸配列 43...352 第一反復配列  
 配列

アミノ酸配列 367...712 第二反復配列  
 アミノ酸配列 714...1059 第三反復配列  
 アミノ酸配列 1070...1408 第四反復配列  
 アミノ酸配列 1421...1443 膜結合ドメイン

```

TACTCAGAGG TCCCCAGACAC CTGCAAGACT GAGGG ATG GAG TCA TGG CCA GGC  53
          Met Glu Ser Trp Pro Gly
           1             5
GTT TCC CTG GTG GGA CTG CTG CTG CTA CTG CTG GGA CAA GGG CCC 101
Val Ser Leu Val Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Gln Gly Pro
           10            15            20
TCC CAA ATC CAC GGC TCT TCT GGA GAA AAC ACA TCG CAG CCC CAG CAA 149
Ser Gln Ile His Gly Ser Ser Gly Glu Asn Thr Ser Gln Pro Gln Gln
           25            30            35

```

#### 【0043】

```

GTG TTT CGG ACC CTG AAG AAT TTT TCA TTC CCT TGC AAG CCA AAG AAG 197
Val Phe Arg Thr Leu Lys Asn Phe Ser Phe Pro Cys Lys Pro Lys Lys
           40            45            50
TTA GAA CTG AGT GTG CTT TCT AAG TCA GTT CAC TCT CTG AGA CCC TCA 245
Leu Glu Leu Ser Val Leu Ser Lys Ser Val His Ser Leu Arg Pro Ser
           55            60            65            70
GAC ATT AAA CTC GTG GCA GCC ATC GGC AAC CTA GAA ACT CCT CCA GCC 293
Asp Ile Lys Leu Val Ala Ala Ile Gly Asn Leu Glu Thr Pro Pro Ala
           75            80            85
CCT GGC TCA GGC GTG GTC AAC ATG GAG AAA CCT CAA AGC CTC GAG AGC 341
Pro Gly Ser Gly Val Val Asn Met Glu Lys Pro Gln Ser Leu Glu Ser
           90            95            100
GAA CTA CAG AAT GTG TGC ATA GGA ATC ATG ACA GCC CTT TCA GAT ATC 389
Glu Leu Gln Asn Val Cys Ile Gly Ile Met Thr Ala Leu Ser Asp Ile
           105           110           115
ATC AGA CAT TTC AAC CCT TCT GTT CTG ATG CCC ACG TGT TCT CCT GGG 437
Ile Arg His Phe Asn Pro Ser Val Leu Met Pro Thr Cys Ser Pro Gly
           120           125           130
AAG GGT ACT GCA GGC CAC ACT ACT ATT GCC GAA GAC TTG TGG ATT CAG 485
Lys Gly Thr Ala Gly His Thr Thr Ile Ala Glu Asp Leu Trp Ile Gln
           135           140           145           150
GCT AAA GAG CTG GTG AGG CAT CTG AAA GAC AAC CCG GAA CTT GAT TTT 533
Ala Lys Glu Leu Val Arg His Leu Lys Asp Asn Pro Glu Leu Asp Phe
           155           160           165
GAG AAG GAC TGG AAA CTC ATC ACT GTG CTC TTC AGT AAC ACA AGC CAG 581
Glu Lys Asp Trp Lys Leu Ile Thr Val Leu Phe Ser Asn Thr Ser Gln
           170           175           180

```

#### 【0044】

```

TGC CAC CTG TGT TCC TCT GAT CAG CAG AAA AGG CAC TTG ATG AAG CAC 629
Cys His Leu Cys Ser Ser Asp Gln Gln Lys Arg His Leu Met Lys His
           185           190           195
ATG GAG ATG CTG TCA GGG GTG CTG GAT TAC CTG CAT CGT GAG GTC CCC 677
Met Glu Met Leu Ser Gly Val Leu Asp Tyr Leu His Arg Glu Val Pro
           200           205           210
AGA GCG TTT GTG AAT TTG GTG GAT CTC TCT GAG GTT TTG ACC ATG GCT 725

```

Arg Ala Phe Val Asn Leu Val Asp Leu Ser Glu Val Leu Thr Met Ala  
 215                    220                    225                    230  
 CAG CAG CAT CAA GAG ACT GGT TTC AGC CCT GCA CCA GAG ATT TGC AAA 773  
 Gln Gln His Gln Glu Thr Gly Phe Ser Pro Ala Pro Glu Ile Cys Lys  
 235                    240                    245  
 TGC TCA GAG GAA ATA ACG AAG TTA TCC AAG GCT GTC ATG CAG TGG TCC 821  
 Cys Ser Glu Glu Ile Thr Lys Leu Ser Lys Ala Val Met Gln Trp Ser  
 250                    255                    260  
 TAT CAG GAA GCC TGG GAA GAT CTC CTG GCC TCC AGC AAG TTC AAT AAG 869  
 Tyr Gln Glu Ala Trp Glu Asp Leu Leu Ala Ser Ser Lys Phe Asn Lys  
 265                    270                    275  
 CAT GAG ACC TTC GCT GTG GTT TTC CAG TCT TTC TCT GAG GTA GAA 917  
 His Glu Thr Phe Ala Val Val Phe Gln Ser Phe Phe Ser Glu Val Glu  
 280                    285                    290  
 CTA CCC TTG GAG AGG CCC TCG CCC CAG GAT TCC ACC ACG CTC GCC CTC 965  
 Leu Pro Leu Glu Arg Pro Ser Pro Gln Asp Ser Thr Thr Leu Ala Leu  
 295                    300                    305                    310  
 AGG ATC TGG AAT AGC ATG ATG GAA CCA GTG GGT CGA AAG GAT GGG ACA 1013  
 Arg Ile Trp Asn Ser Met Met Glu Pro Val Gly Arg Lys Asp Gly Thr  
 315                    320                    325

【0045】

CTC AAT GAA GCA GAG AGA AAA ACA ATG AAA TGT CCC TCT CAG GAG AGC 1061  
 Leu Asn Glu Ala Glu Arg Lys Thr Met Lys Cys Pro Ser Gln Glu Ser  
 330                    335                    340  
 CCC TAT CTG TTC ACC TAC AGA AAT AGC AAC TAC CAG GCC AGA CAG CTG 1109  
 Pro Tyr Leu Phe Thr Tyr Arg Asn Ser Asn Tyr Gln Ala Arg Gln Leu  
 345                    350                    355  
 AAA CCC ATA GGA AAG TTT CAG ATG AAA GAA GGA ACA AAA TTC ACC TGT 1157  
 Lys Pro Ile Gly Lys Phe Gln Met Lys Glu Gly Thr Lys Phe Thr Cys  
 360                    365                    370  
 CCT GAC AAA GAC CCC TCG GAC TCC ATC CCC ACA ACA GTT CAC AGG CTG 1205  
 Pro Asp Lys Asp Pro Ser Asp Ser Ile Pro Thr Thr Val His Arg Leu  
 375                    380                    385                    390  
 AGG CCG GCT GAC ATC AAG GTC ATC GGA GCC ATG GGT GAC TCG CTC ACG 1253  
 Arg Pro Ala Asp Ile Lys Val Ile Gly Ala Met Gly Asp Ser Leu Thr  
 395                    400                    405  
 GCA GGC AAC GGG GCA GGG TCC AGC CCT GGG AAT GTC TTG GAT GTC TTA 1301  
 Ala Gly Asn Gly Ala Gly Ser Ser Pro Gly Asn Val Leu Asp Val Leu  
 410                    415                    420  
 ACT CAA TAC CGA GGC CTG TCG TGG AGT GTG GGC GGA GAT GAG ACC ATC 1349  
 Thr Gln Tyr Arg Gly Leu Ser Trp Ser Val Gly Gly Asp Glu Thr Ile  
 425                    430                    435  
 GAG ACC GTG ACC ACC CTA GCC AAC ATC CTC CGG GAA TTC AAC CCC TCC 1397  
 Glu Thr Val Thr Thr Leu Ala Asn Ile Leu Arg Glu Phe Asn Pro Ser  
 440                    445                    450  
 TTG AAG GGC TTC TCT GTT GGC ACT GGG AAA GAA AAC ACT CCC CGA GCA 1445  
 Leu Lys Gly Phe Ser Val Gly Thr Gly Lys Glu Asn Thr Pro Arg Ala  
 455                    460                    465                    470

【0046】

TCC TTC AAC CAG GCC GTA GCA GGA GCC AAA TCT GAT GGC TTA GCT GCC 1493

Ser Phe Asn Gln Ala Val Ala Gly Ala Lys Ser Asp Gly Leu Ala Ala  
 475                          480                          485  
 CAG GCC AAA AAG CTG GTG AGC CTG ATG AAG GAT GAC AAG ACA ATA AAC 1541  
 Gln Ala Lys Lys Leu Val Ser Leu Met Lys Asp Asp Lys Thr Ile Asn  
 490                          495                          500  
 TTT CAG GAA GAC TGG AAG ATA ATC ACT GTG TTT ATA GGA GGC AAC GAC 1589  
 Phe Gln Glu Asp Trp Lys Ile Ile Thr Val Phe Ile Gly Gly Asn Asp  
 505                          510                          515  
 CTC TGT GGC TCC TGC AAT AAC CTG GCT CGC TTT TCT CCC CAA ACC TTC 1637  
 Leu Cys Gly Ser Cys Asn Asn Leu Ala Arg Phe Ser Pro Gln Thr Phe  
 520                          525                          530  
 ACA GAC AAC ATC AAG ACG GCC CTG GAC ATC CTC CAT GCA GAG GTT CCC 1685  
 Thr Asp Asn Ile Lys Thr Ala Leu Asp Ile Leu His Ala Glu Val Pro  
 535                          540                          545                          550  
 CGG GCC TTT GTG AAC ATG GTC TCG GTG ATT GAG ATC ACC CCC TTG AGA 1733  
 Arg Ala Phe Val Asn Met Val Ser Val Ile Glu Ile Thr Pro Leu Arg  
 555                          560                          565  
 GAA CTG TTC AAT GAA CCT AAA GTC AGC TGC CCA CGG ATG ATC CTC AGG 1781  
 Glu Leu Phe Asn Glu Pro Lys Val Ser Cys Pro Arg Met Ile Leu Arg  
 570                          575                          580  
 AGC CTG TGT CCT TGT GTC TTG AAC CTT GGT GAG AAC TCA GCA GAA CTT 1829  
 Ser Leu Cys Pro Cys Val Leu Asn Leu Gly Glu Asn Ser Ala Glu Leu  
 585                          590                          595  
 GCC CAA CTT CTG GAA AGG AAC AGG CAG TAT CAG GAA GAA ACT GGA AAA 1877  
 Ala Gln Leu Val Glu Arg Asn Arg Gln Tyr Gln Glu Glu Thr Gly Lys  
 600                          605                          610

【0047】

CTG ATT GAG AGT GGC CGA TAC GAC ACC AGG GAT GAC TTC ACC GTG GTC 1925  
 Leu Ile Glu Ser Gly Arg Tyr Asp Thr Arg Asp Asp Phe Thr Val Val  
 615                          620                          625                          630  
 CTC CAG CCC ATG TTT GAA AAT GTC GTC ATG CCA CGG ACC CTG GAG GGC 1973  
 Leu Gln Pro Met Phe Glu Asn Val Val Met Pro Arg Thr Leu Glu Gly  
 635                          640                          645  
 TTG CCC GAC AGC TCT TTC TTT GCC CCT GAC TGT TTC CAC TTC AAT GTC 2021  
 Leu Pro Asp Ser Ser Phe Phe Ala Pro Asp Cys Phe His Phe Asn Val  
 650                          655                          660  
 AAG ACT CAC GCT CGC TCA GCC ATC GCC CTC TGG AAG AAC ATG CTA GAA 2069  
 Lys Thr His Ala Arg Ser Ala Ile Ala Leu Trp Lys Asn Met Leu Glu  
 665                          670                          675  
 CCT GTG GGC CGC AAG ACA AGA CAT CAG AAT TTT GAA ATC AAG GTC CCT 2117  
 Pro Val Gly Arg Lys Thr Arg His Gln Asn Phe Glu Ile Lys Val Pro  
 680                          685                          690  
 ATC ATG TGT CCA AAC CAG ACC TCA CCG TTT CTG AGC ACC ACC AAG AAC 2165  
 Ile Met Cys Pro Asn Gln Thr Ser Pro Phe Leu Ser Thr Thr Lys Asn  
 695                          700                          705                          710  
 AGC AAC CTG GGA CAT GGA ACT TCG ATG TCT TGT GAG GAG AAA GCC CCC 2213  
 Ser Asn Leu Gly His Gly Thr Ser Met Ser Cys Glu Glu Lys Ala Pro  
 715                          720                          725  
 TCT GCC TCA CCA CCA ACC TCA GTG CAT ACC CTG AGA CCT GCA GAC ATC 2261  
 Ser Ala Ser Pro Pro Thr Ser Val His Thr Leu Arg Pro Ala Asp Ile

730	735	740
CAA GTT GTG GCA GCT CTG GGA GAC TCT GTG ACT GCT GGC AAT GGA ATC 2309		
Gln Val Val Ala Ala Leu Gly Asp Ser Val Thr Ala Gly Asn Gly Ile		
745	750	755

【0048】

AGC TCC CAA GAA GGT GAT CTC GCT GAT GTT ACC ACA CAG TAT CGA GGA 2357		
Ser Ser Gln Glu Gly Asp Leu Ala Asp Val Thr Thr Gln Tyr Arg Gly		
760	765	770
CTG TCC TAC AGT GCT GGT GGG GAC AAG TTC CTG GAG AAT GTG ACC ACC 2405		
Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Gly Asp Lys Phe Leu Glu Asn Val Thr Thr		
775	780	785
TTG CCC AAC ATC CTC CGG GAA TTT AAT GGA AAT CTC ACA GGC TAC TCA 2453		
Leu Pro Asn Ile Leu Arg Glu Phe Asn Gly Asn Leu Thr Gly Tyr Ser		
795	800	805
GTC GGA ACC GGT GAC GTC AAC TCT GCA AGC GCG TTC CTT AAC CAG GCT 2501		
Val Gly Thr Gly Asp Val Asn Ser Ala Ser Ala Phe Leu Asn Gln Ala		
810	815	820
GTC CCT GGG GCA AAG GCT GAG AAC CTT GCA AGT CAA GTC CAG ACT CTG 2549		
Val Pro Gly Ala Lys Ala Glu Asn Leu Ala Ser Gln Val Gln Thr Leu		
825	830	835
ATT CAG AAG ATG AAG AAT GAC ACC AGA GTG AAC TTT CAC CAA GAC TGG 2597		
Ile Gln Lys Met Lys Asn Asp Thr Arg Val Asn Phe His Gln Asp Trp		
840	845	850
AAG GTC ATC ACT GTG ATG ATT GGG GCC AGC GAC TTG TGT GAC TTC TGC 2645		
Lys Val Ile Thr Val Met Ile Gly Ala Ser Asp Leu Cys Asp Phe Cys		
855	860	865
AAG GAT TCG AAT CGT TAC TCT GCA GCC AAT TTT TCT GAC CAT CTC CGC 2693		
Lys Asp Ser Asn Arg Tyr Ser Ala Ala Asn Phe Ser Asp His Leu Arg		
875	880	885
AAT GCC TTG GAC ATC CTG CAT AAG GAG GTA CCC AGA GGC CTG GTC AAC 2741		
Asn Ala Leu Asp Ile Leu His Lys Glu Val Pro Arg Ala Leu Val Asn		
890	895	900

【0049】

CTT GTG GAC TTC ATG AAC CCC AGT ATC ATT CCG CAA GTG TTC CTG AAG 2789		
Leu Val Asp Phe Met Asn Pro Ser Ile Ile Arg Gln Val Phe Leu Lys		
905	910	915
AAC CCA GAC AAG TGC CCT GTG AAT CAG ACC AGT GTC CTG TGC AAC TGT 2837		
Asn Pro Asp Lys Cys Pro Val Asn Gln Thr Ser Val Leu Cys Asn Cys		
920	925	930
GTT CTG ACC CCA GGG GAG GAT TCC CAT GAG CTG GCA AGG TTG GAG GCC 2885		
Val Leu Thr Pro Gly Glu Asp Ser His Glu Leu Ala Arg Leu Glu Ala		
935	940	945
TTC ACC AAA TCC TAC CAG AGT AGC ATG CTT CAA CTG GTT GAG TCA GGC 2933		
Phe Thr Lys Ser Tyr Gln Ser Ser Met Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly		
955	960	965
CGC TAC GAC ACC CGG GAG GAT TTC TCT GTG GTA CTG CAG CCC TTT CTC 2981		
Arg Tyr Asp Thr Arg Glu Asp Phe Ser Val Val Leu Gln Pro Phe Leu		
970	975	980
TTC AAC ATC AGG CTC CCC ATC CTA GAG AAT GGG AAT CCA GAT ACA TCC 3029		
Phe Asn Ile Arg Leu Pro Ile Leu Glu Asn Gly Asn Pro Asp Thr Ser		

985	990	995
TTC TTT GCC CCA GAC TGC ATC CTC CTA AGC CAG AAG TTC CAC ACT CAG 3077		
Phe Phe Ala Pro Asp Cys Ile Leu Leu Ser Gln Lys Phe His Thr Gln		
1000	1005	1010
CTC GCG AGA GCC CTT TGG GCC AAT ATG CTT GAA CCC CTG GGA AAG AAA 3125		
Leu Ala Arg Ala Leu Trp Ala Asn Met Leu Glu Pro Leu Gly Lys Lys		
1015	1020	1025
ATG GAT ACT TTG GAC CGG AAA GAA CTC ATA GCT TTG GCC TGC CCC ACC 3173		
Met Asp Thr Leu Asp Pro Lys Glu Leu Ile Ala Leu Ala Cys Pro Thr		
1035	1040	1045

**[0050]**

AAG GAC AAG CCC TTC CTG AGA ACC TTC CCG AAC AGT AAC TAC ACG TAC 3221		
Lys Asp Lys Pro Phe Leu Arg Thr Phe Arg Asn Ser Asn Tyr Thr Tyr		
1050	1055	1060
CCT ATC AAG CCA GCC ATT GAG AAT TGG GGC AGT GAC TTC CTG TGC ACA 3269		
Pro Ile Lys Pro Ala Ile Glu Asn Trp Gly Ser Asp Phe Leu Cys Thr		
1065	1070	1075
GAG CAG AGT CCT TCC AGC AAG GTA CCC ACC TCA GTT CAT GAG CTC CGA 3317		
Glu Gln Ser Pro Ser Ser Lys Val Pro Thr Ser Val His Glu Leu Arg		
1080	1085	1090
CCA TCA GAC ATC AAG GTG GTG GCA GCA ATG GGT GAC TTT CTG ACG ACA 3365		
Pro Ser Asp Ile Lys Val Val Ala Ala Met Gly Asp Phe Leu Thr Thr		
1095	1100	1105
GCC ACC GGA GCT CGA CCA AGT GAG TCC AGC AGT CTA GAC ACC CCC TGG 3413		
Ala Thr Gly Ala Arg Pro Ser Glu Ser Ser Leu Asp Thr Pro Trp		
1115	1120	1125
AGG GGG CTG TCT TGG AGC ATT GGA GGA GAT GGA ACG TTG GAG ACC CAT 3461		
Arg Gly Leu Ser Trp Ser Ile Gly Gly Asp Gly Thr Leu Glu Thr His		
1130	1135	1140
ACC ACA CTG CCC AAC ATC CTG AAG AAG TTC AAC CCT TCC ATC CTT GGA 3509		
Thr Thr Leu Pro Asn Ile Leu Lys Phe Asn Pro Ser Ile Leu Gly		
1145	1150	1155
TTC TCC ACC GGT ACC CTG GAG AAC ACG GCA GGA TTA AAT GTG GCA GAA 3557		
Phe Ser Thr Gly Thr Leu Glu Asn Thr Ala Gly Leu Asn Val Ala Glu		
1160	1165	1170
GAA GGC GCC AGA GCT CAG GAC ATG CCG GCC CAG GCT CAG GCC CTG GTG 3605		
Glu Gly Ala Arg Ala Gln Asp Met Pro Ala Gln Ala Gln Ala Leu Val		
1175	1180	1185
1190		

**[0051]**

AAG AAG ATG AAA AGC ACC CCT ACA ATC AAC ATA CAG GAA GAC TGG AAG 3653		
Lys Lys Met Lys Ser Thr Pro Thr Ile Asn Ile Gln Glu Asp Trp Lys		
1195	1200	1205
CTG ATT ACA CTC CTC ATC GGG AAC AAC GAC CTG TGT CTT TAC TGT GAG 3701		
Leu Ile Thr Leu Leu Ile Gly Asn Asn Asp Leu Cys Leu Tyr Cys Glu		
1210	1215	1220
GAT CCG GAG AAC TAC TCA ACC AGG GAG TAT GTC AAG TAC ATC CAG CAT 3749		
Asp Pro Glu Asn Tyr Ser Thr Arg Glu Tyr Val Lys Tyr Ile Gln His		
1225	1230	1235
GCC TTG GAC ATC TTC TAT GAG GAG CTT CCC AGG GTT TTC ATC AAC GTG 3797		
Ala Leu Asp Ile Phe Tyr Glu Glu Leu Pro Arg Val Phe Ile Asn Val		

1240	1245	1250
GTG GAA GTC ATG GAG CTG TCC GGT CTG CTC CAC GAC CAG GGC GGG AAA 3845		
Val Glu Val Met Glu Leu Ser Gly Leu Leu His Asp Gln Gly Gly Lys		
1255	1260	1265
TGT GCC ATG CCG TTG GCT GTC CAG AAA AAC TGC AGT TGC CTT AAA CGC 3893		
Cys Ala Met Pro Leu Ala Val Gln Lys Asn Cys Ser Cys Leu Lys Arg		
1275	1280	1285
TCT CAA AAC CTC ATG GCA ATG CAG GAG CTG AAG AAA GTC AAC GGG AAC 3941		
Ser Gln Asn Leu Met Ala Met Gln Glu Leu Lys Lys Val Asn Gly Asn		
1290	1295	1300
CTC CAG AGT GCC CTC TCG GAG CTC TCC TAC TGG CAT CGG TAC ATG CAG 3989		
Leu Gln Ser Ala Leu Ser Glu Leu Ser Tyr Trp His Arg Tyr Met Gln		
1305	1310	1315
CGT GAG GAC TTT GCA GTC ACT GTC CAG CCT TTC CGG AAT ACC TTT 4037		
Arg Glu Asp Phe Ala Val Thr Val Gln Pro Phe Phe Arg Asn Thr Phe		
1320	1325	1330

【0052】

GTC CCA CTG GAT GAG CGT GGG GGC CTC GAC CTC ACT TTC TTC TCT GAA 4085		
Val Pro Leu Asp Glu Arg Gly Gly Leu Asp Leu Thr Phe Phe Ser Glu		
1335	1340	1345
GAC TGT TTC CAC TTC TCA GTC CGT GGG CAT GCT GAG ATG GCC ATT GCC 4133		
Asp Cys Phe His Phe Ser Val Arg Gly His Ala Glu Met Ala Ile Ala		
1355	1360	1365
CTC TGG AAC AAC ATG CTG GAA CCA GTG GGC AAG AAG ACA ACC TCC AAT 4181		
Leu Trp Asn Asn Met Leu Glu Pro Val Gly Lys Lys Thr Thr Ser Asn		
1370	1375	1380
AAC TTC ACA TAC AAC CGG ACC AAA CTC AAG TGT CCC TCG CCT GAA AAC 4229		
Asn Phe Thr Tyr Asn Arg Thr Lys Leu Lys Cys Pro Ser Pro Glu Asn		
1385	1390	1395
CCT TTC CTC TAC ACT GTC CGG AAC AGT CAG ATT CTT CTA GAC AAG GCT 4277		
Pro Phe Leu Tyr Thr Val Arg Asn Ser Gln Ile Leu Leu Asp Lys Ala		
1400	1405	1410
AAA GAA AAC TCC AAT ACA CTC TAC TGG GCA GTG CCA GTG GCT GCA GTA 4325		
Lys Glu Asn Ser Asn Thr Leu Tyr Trp Ala Val Pro Val Ala Ala Val		
1415	1420	1425
GGT GGC CTG GTA GTT GGC ATC CTT GGA ATG ATG TTG TGG AGA ACT GTG 4373		
Gly Gly Leu Val Val Gly Ile Leu Gly Met Met Leu Trp Arg Thr Val		
1435	1440	1445
AGA CTC GTC CAA TAG AA GGAGGAGGAG ACTTTCCAATACAAGTGT 4420		
Arg Leu Val Gln ***		
1450		
GGACCTTGAG TTGACCCAGG GATGCTGTTT CAGAGGAGAA GCTCAGAGAT 4470		
TGACCTTGG TACAGACAG CAATTACGTA ATCTCAGGGA TGGGGACTGC 4520		
GTGCCCTTCT CTCTTGGAG TTCACCATCT TCTTTGGAA AGATAAATAA 4570		
GAAAGAGTGG CTACATCAGT AAAAAAAA AAAAAAAA AAA 4613		

【0053】配列番号：2

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

配列

Glu Gly Thr Lys Phe Thr Cys Pro Asp Lys Asp Pro Ser Asp Ser Ile

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク

1 5 10 15

Pro

【0054】配列番号：3

配列の長さ：30

配列の型：アミノ酸

配列

Phe	Ser	Pro	Gln	Thr	Phe	Thr	Asp	Asn	Ile	Lys	Thr	Ala	Leu	Asp	Ile
1	5	10	15												
Leu	His	Ala	Glu	Val	Pro	Arg	Ala	Phe	Val	Asn	Met	Val	Ser		
				20				25					30		

【0055】配列番号：4

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク

配列の型：核酸

配列

CCGGATCCAA RTTYACITGY CCIGAYAARG AYCC 34

【0056】配列番号：5

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

GCIGTYTTIA TRTRTCIGT RAANGTYTG 29

#### 【画面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のホスホリパーゼB／リパーゼ酵素の全長構造を示す模式図である。

【図2】図2は、実施例4において作製した各種発現プラスミドの挿入部の構造を示す模式図である。

【図3】図3は、実施例4における各種発現プラスミドの作製の工程を示す図である。

【図4】図4は、実施例4における各種発現プラスミドの作製の工程を示す図である。

【図5】図5は、各種発現プラスミドにより発現されたタンパク質の酵素活性を示すグラフである。

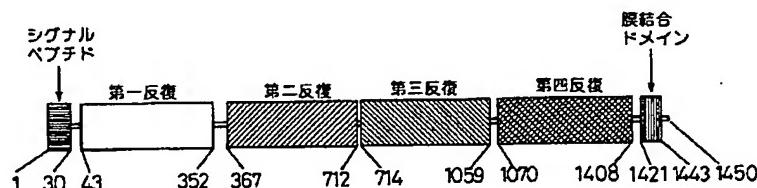
【図6】図6は、各種発現プラスミドにより発現された蛋白質のイムノプロット図、及び各種発現プラスミドに

より形質転換された動物細胞宿主において転写されたmRNAのノーザンプロット図であり、電気泳動の結果を表わす図面代用写真である。

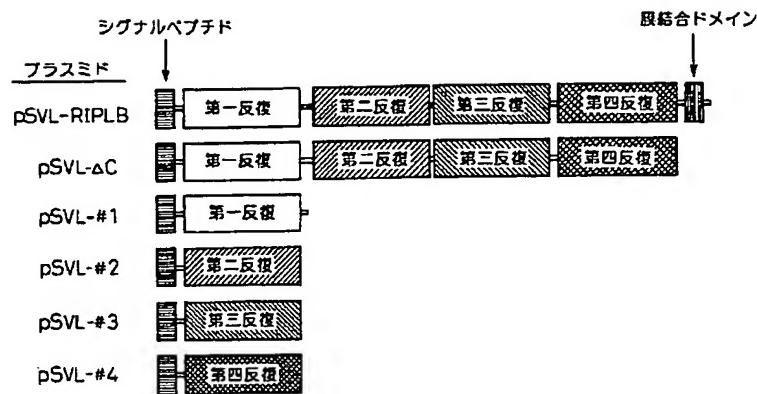
【図7】ラットの種々の組織又は器官から抽出されたRNAを、ホスホリパーゼB／リパーゼをコードするcDNAをプローブとして検出した結果を示すノーザンプロット図であり、電気泳動の結果を示す図面代用写真である。

【図8】図8は、種々の腸粘膜及び食道の組織から抽出したRNAを図6と同様にして検出した結果を示すノーザンプロット図であり、電気泳動の結果を示す図面代用写真である。

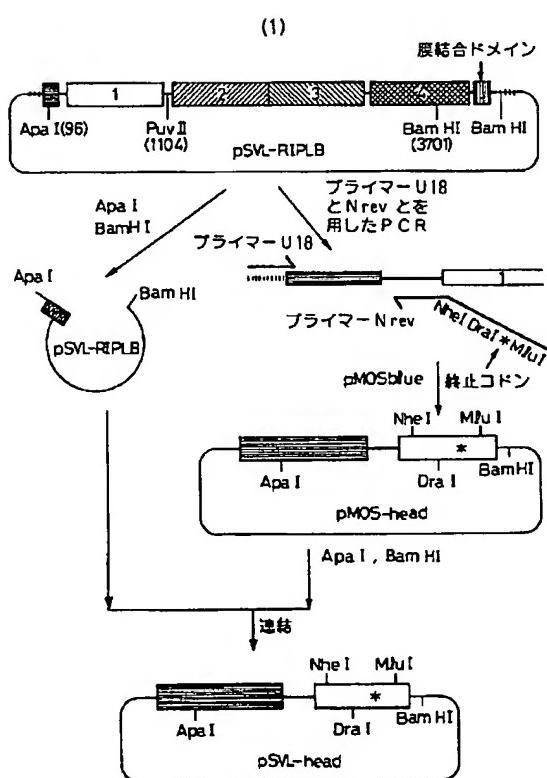
【図1】



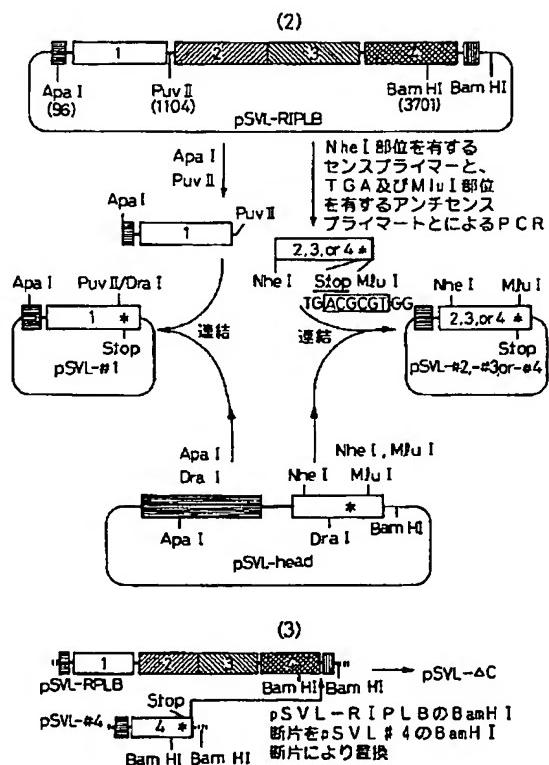
【図2】



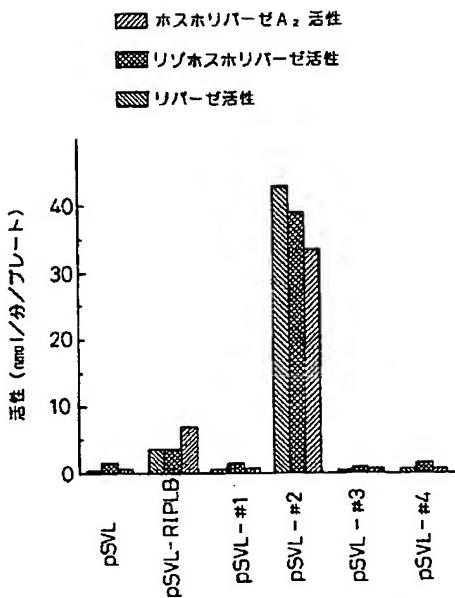
【図3】



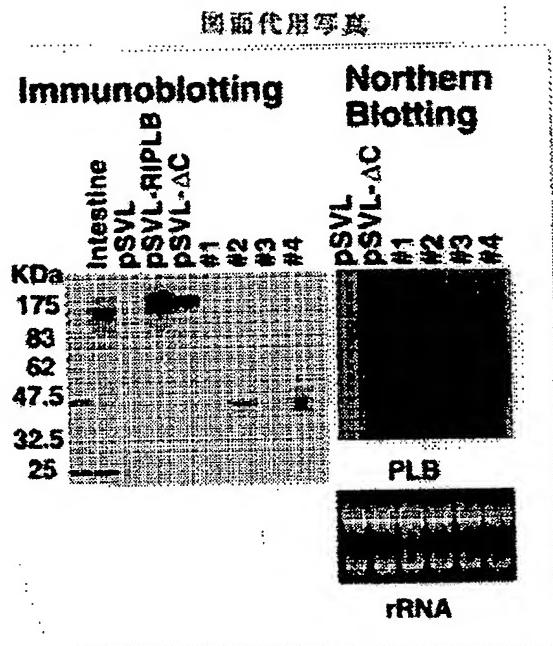
【図4】



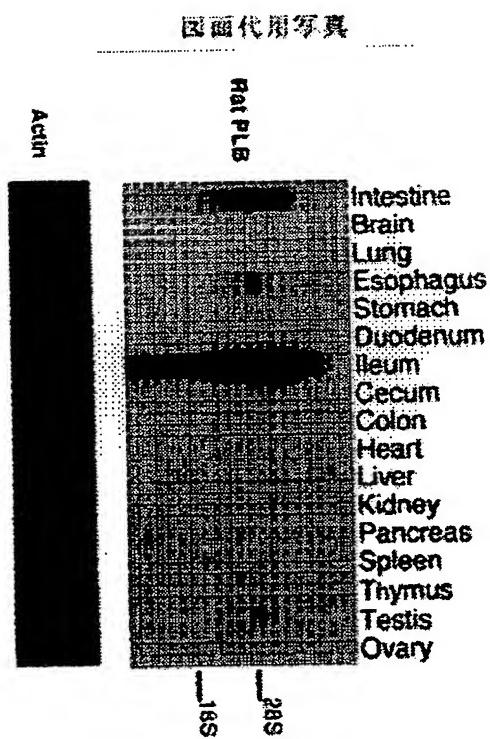
【図5】



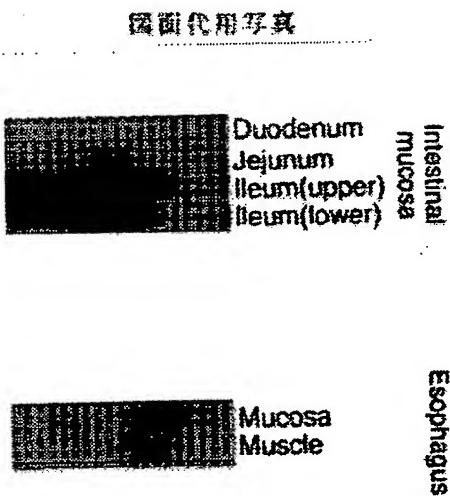
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/20			C 1 2 N 5/00	B
// A 6 1 K 38/46	A C J		A 6 1 K 37/54	A C J
(C 1 2 N 5/10				
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 N 9/16				
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 N 9/20				
C 1 2 R 1:91)				

## NEW PHOSPHOLIPASE AND DNA CODING THE SAME

Patent Number: JP9248190

Publication date: 1997-09-22

Inventor(s): TOJO HIROMASA;; HASEGAWA AKIRA

Applicant(s): TOJO HIROMASA;; TONEN CORP

Requested Patent:  JP9248190

Application Number: JP19960086022 19960315

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N15/09; C07H21/04; C07K14/47; C12N5/10; C12N9/16; C12N9/20

EC Classification:

Equivalents:

### Abstract

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new phospholipase bearing both phospholipase B activity and lipase activity, having a specific amino acid sequence or its variant, thus useful as e.g. a therapeutic agent for replenishing pancreatic phospholipase, a reagent for assaying phospholipase B/lipase.

**SOLUTION:** This new phospholipase bears both phospholipase B activity and lipase activity, has the amino acid sequence at least from the Lys at 367 site to the Asn at 712 site in an amino acid sequence of the formula, or an amino acid sequence modified by substitution, deletion or addition of one or several amino acids in the above sequence, and is useful as e.g. a therapeutic agent for replenishing pancreatic phospholipase, a reagent for assaying phospholipase B/lipase. This new phospholipase is obtained by purification with both column chromatography and electrophoresis of a component limitedly decomposed during preserving a rat small intestine at -35 deg.C for about 2 months after excised under its pentobarbital anesthetization and then solubilized from the brush border membrane.

Data supplied from the esp@cenet database - I2